

β -lactamase 産生菌における Clavulanic acid の β -lactamase inhibitor の効果

—Clavulanic acid と Amoxicillin および Ampicillin との併用による抗菌作用の増強—

五島瑩智子・小川 正俊・金子 康子
宮崎 修一・辻 明良・桑原 章吾
東邦大学医学部微生物学教室

Clavulanic acid の β -lactamase inhibitor 作用を Amoxicillin, Ampicillin との併用により検討した。

Clavulanic acid の抗菌力は弱く、単独では抗菌剤として使用することはできないが、Amoxicillin, Ampicillin との併用によって抗菌力の相乗的増強がみられ、菌の産生する β -lactamase 阻害作用が確認された。

in vitro 抗菌力において Amoxicillin 耐性 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* に対する Amoxicillin と Clavulanic acid の併用効果は各菌種とも著しく、*P. mirabilis*, *P.morganii*, *P. rettgeri*, *P. inconstans* に対しても併用効果がみられた。

Clavulanic acid は β -lactamase の RICHMOND type Ia に弱く、II~V に強い阻害作用がみられた。

マウス実験感染では Amoxicillin, Clavulanic acid, Cephalexin それぞれ単剤では無効な *E. coli*, *K. pneumoniae* の感染において、Amoxicillin と Clavulanic acid の併用により治療効果が認められた。

Clavulanic acid は α -(2R, 5R)-3-(β -hydroxy ethylidene)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo-[3, 2, 0] heptane-2-carboxylic acid で構造式は Fig. 1 に示すようにペニシリンの母核に類似している。

本剤は β -lactamase inhibitor としての作用を有しているが、抗菌力が弱いため、単独では抗菌剤として使用することはできない¹⁾。しかし β -lactamase 産生菌に対して、 β -lactam 剤との併用により、菌の産生する β -lactamase の作用を阻害し、特に β -lactamase に水解され易い β -lactam 剤の抗菌力を増強させることができる^{2,3)}。

本報では、Amoxicillin と Clavulanic acid を 2 : 1 および Ampicillin と Clavulanic acid 1 : 1 の比率で併用した場合の *in vitro*, *in vivo* 抗菌力を検討した実験成績から Clavulanic acid の有用性について報告する。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用菌株

教室保存株および臨床材料から分離されたグラム陰性菌の多数株を用いた。

2. 薬剤

Amoxicillin-Na (AMPC) 842 μ g/mg
(ピーチャム薬品)

Clavulanic acid (CVA)	784 μ g/mg (ピーチャム薬品)
Ampicillin (ABPC)	903 μ g/mg (台糖ファイザー)
Cephalexin (CEX)	900 μ g/mg (万有製薬)

3. 感受性測定法⁴⁾

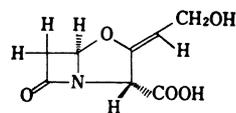
日本化学療法学会標準法に準じて行なった。測定用培地は Muller hinton agar (Difco) を用いた。

Amoxicillin と Clavulanic acid の併用の比率は 2 : 1
Ampicillin と Clavulanic acid の併用は 1 : 1 とした。

4. 殺菌作用

K. pneumoniae 3 K 25 を用い、Muller hinton broth に培養し、菌量が 10^8 cells/ml になったときに、各々の

Fig. 1 Chemical structure of clavulanic acid



C₈H₉NO₅ (m. w. 199.15)

抗菌剤の $\frac{1}{2}$ MIC, 1 MIC, 2 MIC 量を添加し, 37°C にて振盪培養を行なった。

薬剤添加後 1, 2, 4, 6, 9, 24 時間毎に生菌数を測定した。

5. 不活化酵素に対する安定性の測定

1) 酵素液の調製

E. coli ML 1410 RGN 823 株を普通ブイヨン (NB, 栄研) 250 ml にて, 37°C 一夜振盪培養し, 遠心, 集菌後, 少量の NB に浮遊したのち, 超音波にて菌体を破壊した。さらに破壊液を遠心, 無菌濾過し, 濾液を final 250 ml になるように NB で希釈し, 被検酵素液とした。

酵素原液を NB にて 100 倍に希釈し, 酵素液として実験に使用した。

2) 酵素活性の測定 (Bioassay 法)

上記酵素液に Clavulanic acid, Amoxicillin を 2:1 の割合で total 50 $\mu\text{g/ml}$ になるように加え, (Clavulanic acid 16.6 $\mu\text{g/ml}$, Amoxicillin 33.3 $\mu\text{g/ml}$) 37°C で 0.5, 1, 2, 4 時間 incubate した後, 100°C 1 分の熱処理にて酵素を不活化した。

対照として, Clavulanic acid, Amoxicillin, Cephalexin をそれぞれ単剤で使用した。

作用液の薬剤残存力価をそれぞれの薬剤の検定菌を使用した薄層ディスク法により測定した。

また検量線も上記と同様の方法で作成した。

6. マウス実験感染における治療効果

マウスは ICR 系, 雄, 体重 $19 \pm 1\text{g}$, 4 週齢を用い, *E. coli* ML 1410 RGN 823 株, *K. pneumoniae* 3 K 25 株を感染菌とし, 腹腔内に感染させ, 1 時間後に皮下投与, 経口投与にて治療を行なった。

観察は感染後 5 日間行ない, マウスの生残率から ED_{50} を算出した。

ED_{50} は VAN DER WAERDEN method により求めた。

7. マウス血清中濃度

実験感染に用いた同条件のマウスを使用した。

薬剤は Amoxicillin, Clavulanic acid, Cephalexin を用い, 1 mg/mouse, 0.5 mg/mouse を皮下投与したのち, 5 分, 15 分, 30 分, 1 時間, 2 時間後にマウス 9 匹から採血した血液をプールし, それぞれの時点での

Table 1 Combined effect of amoxicillin and clavulanic acid in antibacterial activity

Organisms	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	Amoxicillin	Clavulanic acid	Amoxicillin + Clavulanic acid (2:1)	Cephalexin
<i>S. aureus</i> 209-P	0.39	25	1.56	1.56
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.39	25	≤ 0.19	0.78
<i>E. coli</i> NIHJ. JC-2	3.12	> 100	6.25	12.5
<i>K. pneumoniae</i> IFO 3512	> 100	50	3.12	3.12
<i>K. oxytoca</i> 1004	> 100	> 100	25	> 100
<i>S. flexneri</i> 103R	1.56	> 100	6.25	100
<i>S. typhi</i> S60	0.78	100	1.56	3.12
<i>S. paratyphi</i> B	6.25	50	25	> 100
<i>P. mirabilis</i> 1287	50	> 100	> 100	12.5
<i>P. vulgaris</i> IFO 3851	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>P. morgani</i> IFO 3848	50	> 100	100	> 100
<i>P. rettgeri</i> IFO 13501	100	> 100	100	100
<i>P. inconstans</i> IFO 12930	100	> 100	100	> 100
<i>S. marcescens</i> IFO 12648	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>P. fluorescens</i> IFO 3081	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>P. putida</i> TMS 180	> 100	> 100	100	> 100
<i>P. maltophilia</i> TMS 227	> 100	25	50	> 100
<i>P. cepacia</i> TMS 201	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>A. calcoaceticus</i> NCTC 7844	> 100	50	50	> 100
<i>A. faecalis</i> NCTC 655	> 100	100	25	> 100
<i>A. xylooxidans</i> TMS 73	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>K. meningosepticum</i> TMS 462	50	6.25	12.5	> 100

Inoculum size 10^8 cells/ml

血清中濃度を測定した。

測定法は Amoxicillin は *Micrococcus luteus* ATCC 9341 株, Clavulanic acid は *K. pneumoniae* ATCC 29665 株, Cephalexin は *Bacillus subtilis* ATCC 6633 株を検定菌とする薄層ディスク法を用いた。なお検量線はマウス血清で希釈した薬剤にて, 上記と同様の方法で作成した。

II. 実験成績

1. Amoxicillin, Clavulanic acid 2:1 併用における抗菌力の変動

1) 標準菌株の MIC (Table 1, 2)

教室保存の各菌株について, Amoxicillin, Clavulanic acid 単剤および Amoxicillin と Clavulanic acid 2:1 併用時の MIC を Cephalexin と比較し Table 1, 2 に示した。

Clavulanic acid 単剤の抗菌力は弱い, Amoxicillin との併用により, Amoxicillin 耐性の *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* に対し, 各々の単剤よりも強い抗菌力が認められた。

Proteus の中では, *P. vulgaris* に Amoxicillin と

Clavulanic acid の併用効果がみられた。

2) 各種の β -lactamase 産生菌株に対する MIC (Table 3)

各種菌株の β -lactamase の種類を RICHMOND type で示し, その菌株に対する Clavulanic acid の作用を MIC による抗菌力をもって比較した成績を Table 3 に示した。

Amoxicillin と Clavulanic acid 2:1 の併用により RICHMOND type II~V の β -lactamase を産生する菌株に対する MIC が小さくなり抗菌力の増強がみられた。

しかし, MIC で比較する場合 *P. vulgaris* 9 株では抗菌力の増強が認められているが, 同じ β -lactamase の type V を産生する *P. aeruginosa* 47 株では MIC は変わらない。これは, この菌株の耐性機構が β -lactamase によらないためと考えられる。

2. 臨床分離株の感受性分布 (Fig 2, 3)

1) Amoxicillin と Clavulanic acid (2:1) の併用
臨床材料から分離した *E. coli* 17 株, *K. pneumoniae* 22 株, *P. mirabilis* 20 株, *P. vulgaris* 17 株, *P. morganii* 20 株, *P. rettgeri* 20 株, *P. inconstans* 19

Table 2 Combined effect of amoxicillin and clavulanic acid in antibacterial activity

Organisms	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	Amoxicillin	Clavulanic acid	Amoxicillin + Clavulanic acid (2:1)	Cephalexin
<i>S. aureus</i> 209-P	≤ 0.19	25	≤ 0.19	0.78
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	≤ 0.19	25	≤ 0.19	0.39
<i>E. coli</i> NIHJ.JC-2	3.12	12.5	6.25	3.12
<i>K. pneumoniae</i> IFO 3512	> 100	25	1.56	3.12
<i>K. oxytoca</i> 1004	100	25	3.12	1.56
<i>S. flexneri</i> 103R	1.56	12.5	3.12	3.12
<i>S. typhi</i> S60	0.39	12.5	0.78	0.78
<i>S. paratyphi</i> B	≤ 0.19	25	0.39	3.12
<i>P. mirabilis</i> 1287	0.39	12.5	0.78	3.12
<i>P. vulgaris</i> IFO 3851	25	25	0.78	12.5
<i>P. morganii</i> IFO 3848	12.5	50	25	12.5
<i>P. rettgeri</i> IFO 13501	0.78	100	3.12	6.25
<i>P. inconstans</i> IFO 12930	25	> 100	100	12.5
<i>S. marcescens</i> IFO 12648	50	100	100	> 100
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>P. fluorescens</i> IFO 3081	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>P. putida</i> TMS180	100	> 100	100	> 100
<i>P. maltophilia</i> TMS 227	> 100	25	25	> 100
<i>P. cepacia</i> TMS 201	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>A. calcoaceticus</i> NCTC 7844	> 100	12.5	25	> 100
<i>A. faecalis</i> NCTC 655	25	50	3.12	6.25
<i>A. xylosoxidans</i> TMS 73	3.12	12.5	6.25	> 100
<i>F. meningosepticum</i> TMS 462	12.5	3.12	6.25	> 100

Inoculum size 10^6 cells/ml

Table 3 Effects of *in vitro* antibacterial activity against various β -lactamase producing strains of clavulanic acid

Organism	Antibiotic	RICH-MOND type	Amoxicillin	Clavulanic acid	Amoxicillin + Clavulanic acid (2:1)	Cephalexin
<i>S. aureus</i> 35			3.12	12.5	0.78	6.25
<i>S. marcescens</i> 78		I a	> 400	100	400	> 400
<i>P. mirabilis</i> GN125		I a	200	25	100	> 400
<i>P. rettgeri</i> GN624		I a	400	100	400	> 400
<i>P. inconstans</i> GN627		I a	200	200	200	> 400
<i>E. cloacae</i> 91		I a	> 400	50	200	> 400
<i>C. freundii</i> GN346		I a	> 400	25	100	> 400
<i>E. coli</i> 35		I b	200	25	50	400
<i>P. vulgaris</i> GN76		I c	200	50	12.5	> 400
<i>P. aeruginosa</i> 11		I d	> 400	200	400	> 400
<i>P. mirabilis</i> GN79		II b	> 400	25	25	400
<i>E. coli</i> 121		II	400	25	12.5	3.12
<i>E. coli</i> ML1410 RGN14		III	> 400	25	12.5	6.25
<i>E. coli</i> ML1410 RGN823		III	> 400	25	25	6.25
<i>E. coli</i> 18		III	> 400	25	12.5	6.25
<i>K. pneumoniae</i> 134		IV	50	25	1.56	1.56
<i>K. pneumoniae</i> GN69		IV	200	25	6.25	6.25
<i>E. coli</i> ML1410 RGN238		V a	> 400	25	25	6.25
<i>P. vulgaris</i> 9		V	> 400	100	12.5	> 400
<i>P. aeruginosa</i> 47		V	> 400	200	400	> 400

Inoculum size 10^6 cells/ml

株の感受性分布を調べ、Amoxicillin, Clavulanic acid の単剤および Amoxicillin と Clavulanic acid 2:1 の併用時の MIC を比較した成績を Fig. 2 に示した。

併用時の MIC は Amoxicillin を 2, Clavulanic acid を 1 としたそれぞれの濃度で表示した。

E. coli, *K. pneumoniae* に対して、Amoxicillin と Clavulanic acid の併用により抗菌力に強い相乗効果がみられた。

Proteus 群では、*P. vulgaris* に対する Amoxicillin と Clavulanic acid の併用効果ももっとも強く、Amoxicillin, Clavulanic acid 単剤での MIC より著しく小さい値が得られた。

P. mirabilis, *P.morganii* では Amoxicillin と Clavulanic acid の併用効果はほとんど認められず、*P. rettgeri*, *P. inconstans* では僅かな株に抗菌力の増強が認められたのみであった。

2) Ampicillin と Clavulanic acid (1:1) の併用
同様の実験を Ampicillin, Clavulanic acid および Ampicillin と Clavulanic acid (1:1) の併用で行なった成績を Fig. 3 に示した。

この組み合わせでは、*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* に対する抗菌力に強い併用効果がみられた。

P. mirabilis に対してはやや弱い併用による相乗効果が認められ、*P.morganii*, *P. rettgeri*, *P. inconstans* には相乗効果は認められなかった。

3. 殺菌作用における Amoxicillin, Clavulanic acid の併用効果 (Fig. 4)

Fig. 4 は *K. pneumoniae* 3 K 25 株に対する Amoxicillin, Clavulanic acid および Amoxicillin と Clavulanic acid の併用による殺菌作用を Cephalexin も加えて比較した成績である。

Amoxicillin と Clavulanic acid (2:1) 併用時における合剤としての MIC は $6.25 \mu\text{g/ml}$ で Cephalexin と同程度の MIC である。

これは Clavulanic acid 単剤での MIC $50 \mu\text{g/ml}$ の 1/8, Amoxicillin 単剤での MIC $400 \mu\text{g/ml}$ の 1/64 に相当し、明らかな相乗効果が認められた。

Amoxicillin と Clavulanic acid 併用時において $6.25 \mu\text{g/ml}$ (MIC) 添加により、24 時間まで増殖抑制が著明に認められるのに比べ、Clavulanic acid $50 \mu\text{g/ml}$ (MIC) 作用により 9 時間後、Amoxicillin $400 \mu\text{g/ml}$ (MIC), Cephalexin $6.25 \mu\text{g/ml}$ (MIC) では 6 時間後に再増殖が認められた。

4. 大腸菌の不活化酵素に対する阻害効果

Fig. 2 *In vitro* synergistic effects of amoxicillin and clavulanic acid in antibacterial activities

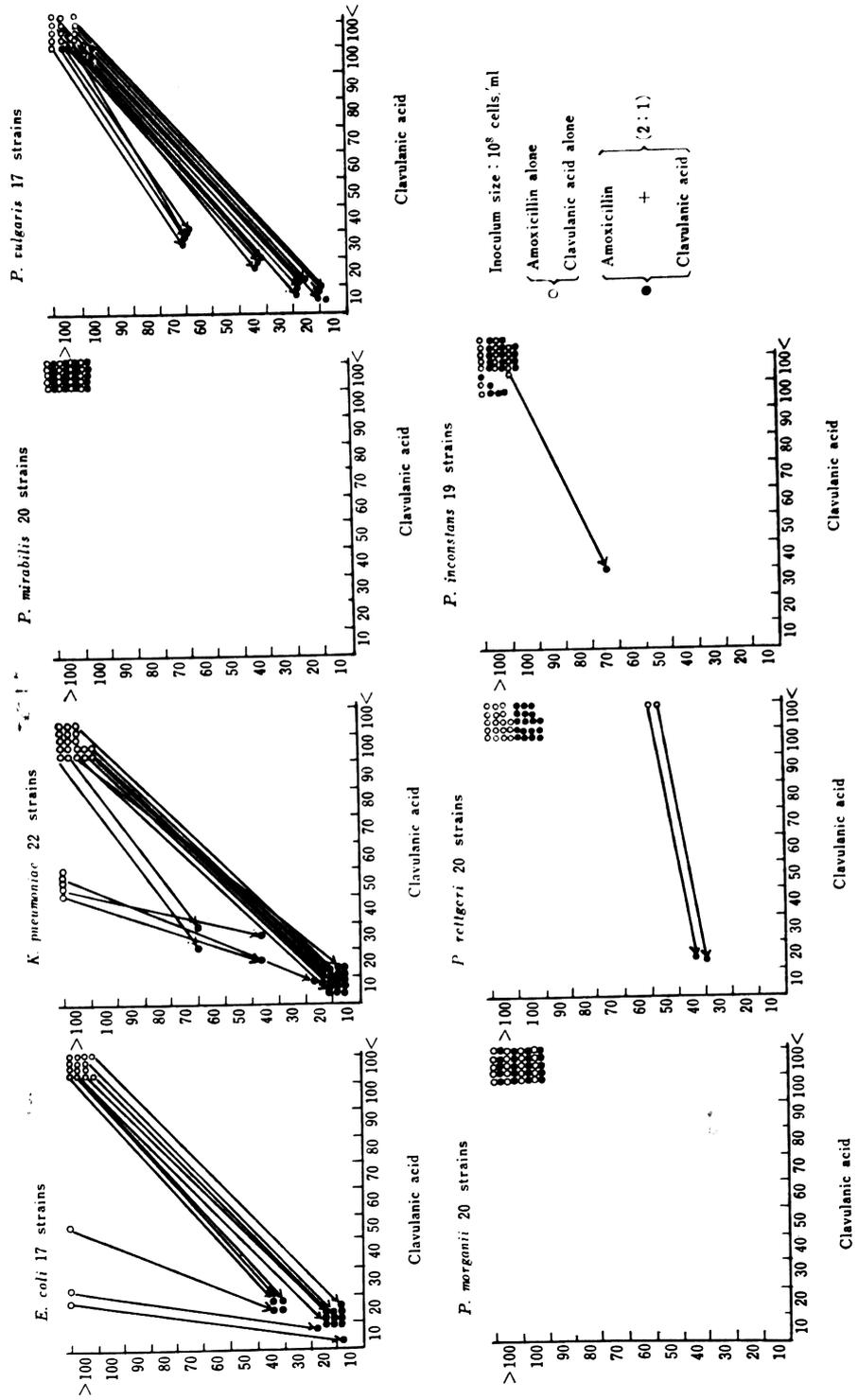


Fig. 3 *In vitro* synergistic effects of ampicillin and clavulanic acid in antibacterial activities

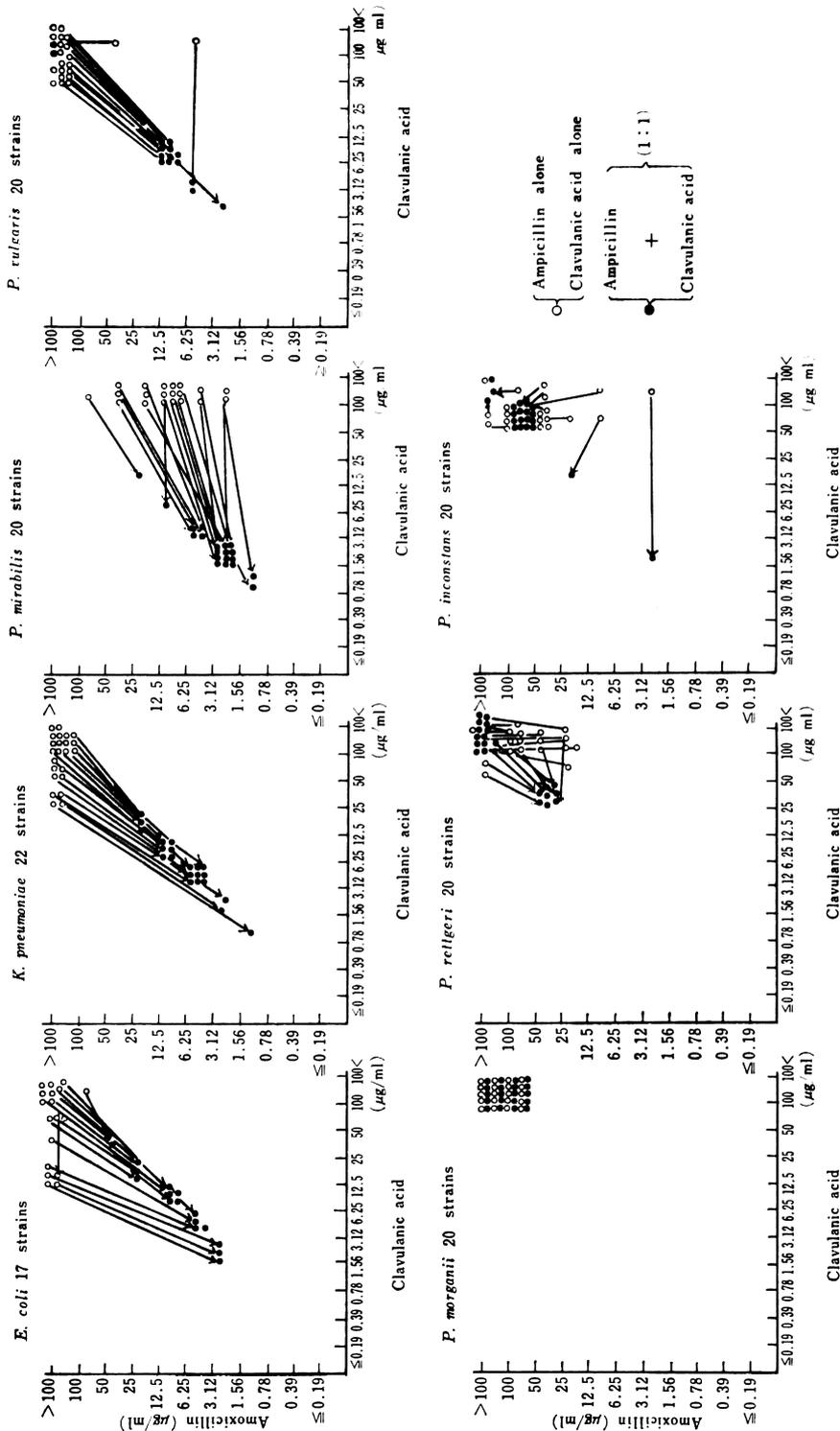
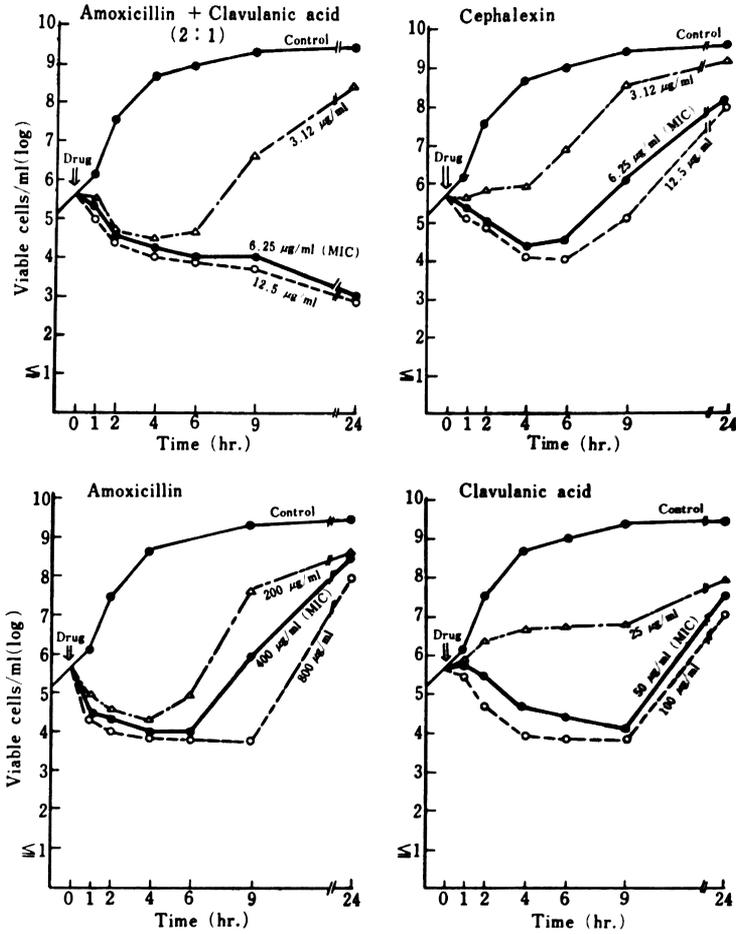


Fig. 4 Bacterial activities of various antibiotics against *Klebsiella pneumoniae*

Test strain: *Klebsiella pneumoniae* 3K-25



E. coli ML 1410 RGN 823 株より得られた不活化酵素阻害作用を単剤の Amoxicillin, Clavulanic acid およびその 2 : 1 の併用において比較した成績を Fig. 5 に示し、同時に行なった Cephalixin の成績も加えた。

Amoxicillin 単剤では 37°C, 30 分の incubation で完全に不活化されるが, Amoxicillin, Clavulanic acid (2 : 1) 併用により, 4 時間後まで力価の減少が認められず, 安定であった。

Clavulanic acid は単剤および Amoxicillin との併用時においても力価の減少は僅かにみられるのみであった。

Cephalixin は作用時間が長くなるにしたがい力価が減少した。

5. マウス実験感染における治療効果

1) *E. coli* 感染 (Table 4)

β -lactamase を産生する *E. coli* ML 1410 RGN 823 株を感染菌としたマウス実験感染において各種薬剤の皮下投与による治療効果を ED₅₀ で表わし Table 4 に示した。

Amoxicillin, Clavulanic acid, Cephalixin それぞれの ED₅₀ 値は 40 mg/mouse 以上を示し, 治療効果は認められないが, Amoxicillin と Clavulanic acid を併用すると 3.15 mg/mouse の ED₅₀ となり, 明らかな治療効果が認められた。

2) *K. pneumoniae* 感染 (Table 5)

K. pneumoniae 3K 25 株を感染菌とした時の経口投与による成績を Table 5 に示した。

K. pneumoniae 3K 25 株では, Amoxicillin, Cla-

Fig. 5 Inhibition of *E. coli* β -lactamase by clavulanic acid

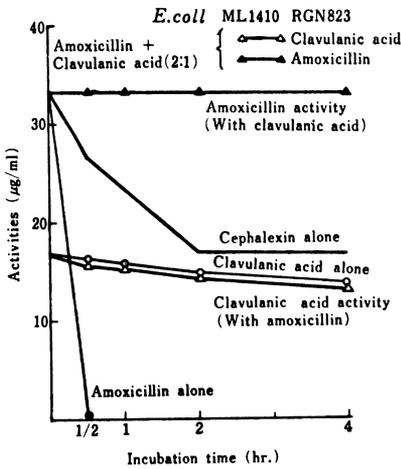


Fig. 6 Serum levels of amoxicillin and clavulanic acid after administration to mouse by S. C.

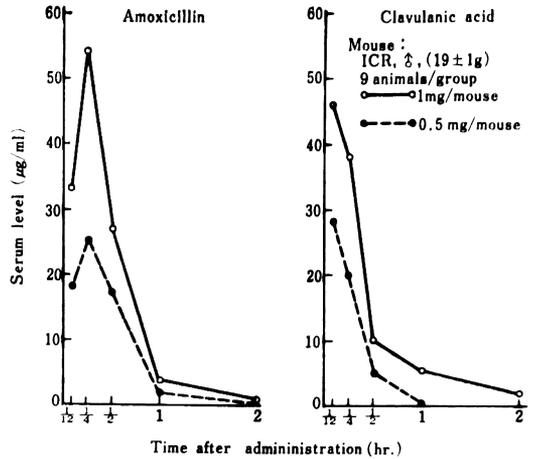


Table 4 Protecting effect of clavulanic acid and amoxicillin against experimental mice infection test strain : *E. coli* ML 1410 RGN 823 (β -lactamase RICHMOND type III)

Antibiotics	Challenge dose (Cells/mouse)	Administration			MIC ($\mu\text{g/ml}$)		ED ₅₀ (mg/mouse)
		Route	Number	After the infection(hr.)	10 ⁵	10 ⁶	
Amoxicillin	6 × 10 ⁷ (+)	S.C.	1	1	> 400	> 400	> 40
Clavulanic acid					> 400	25	> 40
Amoxicillin + Clavulanic acid (2 : 1)					25	25	3.15 (2.2~4.3)
Cephalexin					> 400	6.25	> 40

MLD : 6 × 10⁷ (+)
 (+) : 5% mucin added
 * : VAN DER WAERDEN method
 Mouse : ICR, 4 W, ♂, 19±1g 6 animals/group

Table 5 Protecting effect of clavulanic acid and amoxicillin against experimental mice infection, test strain : *K. pneumoniae* 3K 25

Antibiotics	Challenge dose (Cells/mouse)	Administration			MIC ($\mu\text{g/ml}$)		ED ₅₀ * (mg/mouse)
		Route	Number	After the infection(hr.)	10 ⁵	10 ⁶	
Amoxicillin	1 × 10 ⁷ (+)	P.O.	1	1	> 100	25	> 20
Clavulanic acid					> 100	25	> 20
Amoxicillin + Clavulanic acid (2 : 1)					> 100	3.12	15.84
Cephalexin					> 100	6.25	> 20

MLD : 1 × 10⁶ (+)
 (+) : 5% mucin added
 * : VAN DER WAERDEN method
 Mouse : ICR, 4 W, ♂, 19±1g 6 animals/group

vulanic acid, Cephalexin の ED_{50} 値は 20 mg/mouse 以上を示すのに比べ、Amoxicillin と Clavulanic acid の併用時には 15.84 mg/mouse の ED_{50} で治療効果が認められ、*in vitro* MIC におけると同様、相乗効果が認められた。

6. マウス血清中濃度 (Fig. 6)

Amoxicillin, Clavulanic acid を 2:1 の割合で併用しているが、それがマウス血中でどのような濃度になるか調べるため、それぞれ 1 mg/mouse, 0.5 mg/mouse を皮下投与し、経時的にマウス血清中濃度を測定した。

Amoxicillin は 15 分後がピークで、1 mg/mouse 投与の場合 55 μ g/ml の値を示し、Clavulanic acid ではピークが早く 5 分後に 46 μ g/ml を示した。

両剤の 2:1 の比は、*in vitro* とほぼ同程度に、*in vivo* でもほぼ 2:1 の比で推移すると考えられた。

III. 考察と結論

本実験は Clavulanic acid の β -lactamase inhibitor としての作用を Amoxicillin, Ampicillin との併用により実証することを目的とした。

その結果、*in vitro* では、Amoxicillin, Ampicillin, および Clavulanic acid 共存時に明らかな相乗的抗菌力増強が認められたが、その程度は菌種により異なった。このことは、 β -lactamase の種類によって inhibitor の作用に差のある成績からも裏づけられた。

また Amoxicillin と Clavulanic acid の併用効果は殺菌作用においても認められ、Clavulanic acid 単剤よりも、長時間増殖が抑制され、明らかに殺菌効果の増強が示された。

このことは菌の産生する不活化酵素に対し、単剤では失活するが、Clavulanic acid との併用により、Amoxi-

cillin が安定となる成績とも相関している。

マウス実験感染での成績は *in vitro* の MIC の成績とほぼ相関し、 β -lactamase RICHMOND type III の *E. coli* ML 1410 RGN 823 には Amoxicillin, Clavulanic acid, Cephalexin それぞれの単剤では無効であったが、Amoxicillin と Clavulanic acid の併用により、優れた治療効果がみられ、 β -lactamase に対する安定性と相関していた。

Clavulanic acid, Amoxicillin のマウス血清中濃度は、ほぼ同じレベルで 1:2 の比が血清中でも維持され、このことが *in vitro* と *in vivo* の相関した成績をもたらしたと考えられる。

Amoxicillin と Clavulanic acid の併用は、すべての菌種に同等ではないが、 β -lactamase の種類によっては著しい阻止作用が認められ、該当する菌に対しては、臨床的にも有用性が期待できると考えられた。

文 献

- 1) READING, C. & M. COLE: Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 11: 852~857, 1977
- 2) WISE, R.; J. M. ANDREWS & K. A. BEDFORD: *In vitro* study of clavulanic acid in combination with penicillin, amoxycillin, and carbenicillin. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 13: 389~393, 1978
- 3) Wüst, J. & T. D. WILKINS: Effect of clavulanic acid on anaerobic bacteria resistant to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 13: 130~133, 1978
- 4) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について. *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981

INHIBITION EFFECT OF CLAVULANIC ACID AGAINST β -LACTAMASE PRODUCING STRAINS

—Increase in antibacterial activity of amoxicillin and ampicillin with clavulanic acid—

SACHIKO GOTO, MASATOSHI OGAWA, YASUKO KANEKO,

SHUICHI MIYAZAKI, AKIYOSHI TSUJI and SHOGO KUWABARA

Department of Microbiology, Toho University, School of Medicine

The inhibitory effect of clavulanic acid was investigated with amoxicillin against β -lactamase produced by ampicillin/amoxicillin resistant strains. The antibacterial activity of clavulanic acid was weak, but a potentiating effect was observed against resistant strains producing β -lactamase when combined with amoxicillin or ampicillin. Strong *in vitro* antibacterial activity of amoxicillin concomitant with clavulanic acid was shown against amoxicillin resistant strains of *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. vulgaris*, and the activity expected of the components was observed against resistant strains of *P. mirabilis*, *P. morgani*, *P. rettgeri* and *P. inconstans*.

The β -lactamase inhibitory effect of clavulanic acid was observed against type II, III, IV and V enzymes as classified by RICHMOND, but not against type Ia.

In vivo the formulation of clavulanic acid and amoxicillin was effective in the treatment of experimental intraperitoneal infections produced with resistant strains of *E. coli* and *K. pneumoniae* that did not respond to amoxicillin, clavulanic acid and cephalixin alone.